

# Hedelmöittymisen ja alkutiineyden kannalta merkittävät sytokiinit tammalla

Noora Saaristo

Lisensiaatintutkielma, kirjallisuuskatsaus  
Kotieläinten lisääntymistieteen oppiaine  
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto  
Eläinlääketieteellinen tiedekunta  
Helsingin yliopisto  
2014

## SISÄLLYS

1. Johdanto	1
2. Sytokiinit	2
2.1 Kemokiinit	2
2.2 Tulehdussytokiinit	2
2.3 Tulehdusta hillitsevät sytokiinit	5
3. Yleistä sytokiineista lisääntymisessä	6
4. Sytokiinien merkitys munasarjoissa	6
4.1 Oosyyttien kypsymisen säätely	8
4.2 Keltarauhasen kehityksen säätely	11
5. Sytokiinien merkitys endometriudessa	13
5.1 Endometriumien tulehdusvasteen säätely	14
5.2 Endometriumien sytokiinituotannon erityispiirteet pitkittyneelle siemennyksenjälkeiselle kohtutulehdukselle herkillä tammoilla	15
5.2.1 Kiimakierron vaikutus sytokiinituotantoon	16
5.2.2 Keinosiemennyksen vaikutus sytokiinituotantoon	16
5.2.3 Sperman laimennusnesteiden vaikutus sytokiinituotantoon	22
5.3 Sytokiineihin perustuvat endometriitin hoitomuodot	23
5.3.1 Immunomodulaattorit	23
5.3.2 Glukokortikoidit	25
6. Alkion tuottamat sytokiinit	25
6.1 Invasiivisten trofoblastisolujen sytokiinituotanto	27
6.2 Implantaation säätely	28
7. Johtopäätökset	29

# 1 JOHDANTO

Sytokiini on yleisnimitys pienimolekyylisille proteiineille, jotka toimivat elimistön solujen toimintaa ohjailevina viestimolekyyleinä. Erityinen merkitys sytokiineilla on elimistön puolustusjärjestelmän solujen erilaistumisen, kasvun ja toiminnallisen säätelyn ohjailussa. Keskeisiä immuunijärjestelmää ohjaavia sytokiineja ovat interleukiinit (IL), interferonit (IFN), tuumorinekroositekijä alfa (TNF- $\alpha$ ), ja solutyypispesifiset sytokiinit (katsauksessa Silvennoinen & Hurme 2003).

Sytokiinit toimivat tarkan säätelyn alaisina hierarkisina säätelyverkostoina. Sytokiinien tuotanto lisääntyy paikallisesti esimerkiksi tulehdusalueella tai immuunireaktion yhteydessä. Paikallinen sytokiinituotanto voi johtaa koko elimistön immuunivasteen voimistumiseen. Immuunivastetta lisääviä sytokiineja kutsutaan proinflammatorisiksi sytokiineiksi ja immuunivastetta rajoittavia anti-inflammatorisiksi sytokiineiksi. Proinflammatorisia sytokiineja ovat mm. IL-1, IL-6, IL-8 ja TNF-  $\alpha$ . Keskeisiä anti-inflammatorisia sytokiineja ovat IL-4, IL-10 ja transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) (katsauksessa Silvennoinen & Hurme 2003).

Tamman lisääntymisfysiologiaan vaikuttavia sytokiineja on tutkittu melko vähän. Lisäksi monissa tutkimuksissa tutkittavien tammojen määrä on pieni. Tähän vaikuttanevat sekä koe-eläinten huono saatavuus että tutkimusten rajallinen budjetti. Huomattavasti enemmän tutkimuksia on tehty muilla nisäkkäillä kuten laboratorioeläimillä ja ihmisellä. Arvioitaessa muulla eläinlajilla saatujen tutkimustulosten hyödynnettävyyttä tammalla tai verrattaessa eri lajeilla saatuja tuloksia on hyvä pitää mielessä erot kyseisten lajien lisääntymisfysiologiassa. Läheskään aina tulokset eivät ole verrattavissa tai sovellettavissa toiselle lajille.

Tammalla tehdyt tutkimukset tukevat käsitystä sytokiinien keskeisestä roolista munasolun kypsymisen ja alkutiineyden säätelyssä. Ovulaation ja implantaation välinen aika on alkion selviytymisen kannalta kriittistä ja vaatii onnistuakseen täsmällistä viestintää tapahtumaan osallistuvien solujen välillä. Sytokiinit osallistuvat monin eri mekanismein keltarauhasen ylläpitoon, alkion kiinnittymiseen ja invaasioon, implantaatioon sekä sikiön ja istukan kasvuun ja erilaistumiseen. Tämän

lissensiaatintutkielman tarkoituksena on koota tähän mennessä tehtyjen tutkimusten pohjalta tietoa munasolun kypsymisen ja alkutiineyden kannalta merkittävistä sytokiineista tammalla.

## 2. SYTOKIINIT

Sytokiini on yleisnimitys elimistön solujen välittäjäaineille, joita vapautuu soluista infektion tai muun stimulaation seurauksena (Hedman ym. 2011). Taulukossa 1 esitellään sytokiinien luokittelu, tässä tutkielmassa käsiteltävät sytokiinit ja niiden tärkeimmät biologiset tehtävät.

### 2.1 Kemokiinit

Kemokiinit houkuttelevat selektiivisesti erilaisia valkosolutyyppejä perifeerisiin kudoksiin erityisesti tulehdusreaktion aikana. Kemokiinien selektiivinen toiminta perustuu spesifisiin kemokiinireseptoreihin, joita eri valkosolutyypit ilmentävät pinnallaan. Verisuonen endoteelillä kemokiinin sitoutuminen reseptoriinsa muuttaa endoteelisolua siten, että se sallii valkosolun tunkeutumisen verisuonen seinämän läpi kudokseen (Hedman ym. 2011).

IL-8 on proinflammatorinen sytokiini, joka toimii kemokiinina leukosyyteille ja neutrofiileille houkutellessa niitä tulehduspaikalle ja aktivoiden niitä. Useat solutyypit voivat tuottaa IL-8:a paikallisen tulehduksen stimuloimana (Harada ym. 1994).

### 2.2 Tulehdussytokiinit

Tulehdussytokiineilla IL-1, IL-6 ja TNF- $\alpha$  on merkitystä erityisesti tulehduksen alkuvaiheessa. Ne aktivoivat kohdesolujaan spesifisten reseptoriensa välityksellä. Tämän seurauksena stimuloidut solut tuottavat lisää kemokiineja, proinflammatorisia sytokiineja ja muita biologisesti aktiivisia aineita. Th-1-sytokiineilla on puolestaan tulehdusta ylläpitävä vaikutus (Hedman ym. 2011).

Taulukko 1. Sytokiinien luokittelu ja tärkeimmät biologiset tehtävät (Hedman ym. 2011).

<b>Kemokiinit</b>	<b>Leukosyyttien houkuttelu tulehduspaikalle ja muut kemotaktiset vaikutukset eri solutyypeille</b>
IL-8	Neutrofiilien houkuttelu tulehduspaikalle
<b>Proinflammatoriset sytokiinit</b>	<b>Tulehdusvasteen voimistaminen</b>
IL-1 $\alpha$ ja IL-1 $\beta$	Leukosyyttien, epiteeli- ja endoteelisolujen aktivaatio, pyrogeeniset vaikutukset
IL-6	B- ja T-solujen aktivaatio
TNF- $\alpha$	Solujen aktivaatio, antimikrobipuolustus
Th-1-sytokiinit	Tulehdusvasteen voimistaminen, tarkempi jaottelu alla
<b>Anti-inflammatoriset sytokiinit</b>	<b>Tulehdusvasteen hillitseminen</b>
TGF- $\beta$	Solujen kasvun esto
IL-1-RA	IL-1-reseptorin antagonisti, IL-1-reseptoriin sitoutumisen esto
Th-2-sytokiinit	Tulehdusvasteen hillitseminen, tarkempi jaottelu alla
<b>Th-1-sytokiinit</b>	<b>Soluvälitteisen immunitetin vahvistaminen</b>
IL-2	T- ja NK-solujen kasvutekijä
IFN- $\gamma$	Makrofagien aktivaatio, Th-2-solujen kasvun esto
<b>Th-2-sytokiinit</b>	<b>Vasta-ainevälitteisen immunitetin vahvistaminen</b>
IL-4	B- ja Th-solujen aktivaatio
IL-10	Th-1-sytokiinien vaikutuksen esto, anti-inflammatorinen
<b>Interferonit</b>	<b>Voimistaa solujen vastetta virusinfektioon</b>
IFN- $\gamma$	Immunomodulaatio, solun kasvun esto, antiviraalinen
<b>Kasvutekijät</b>	<b>Säätävät tiettyjen solujen kasvua ja erilaistumista</b>

IL-1 on makrofagien erittämä useisiin immuunijärjestelmän soluihin vaikuttava proteiini. IL-1-perheeseen kuuluvat IL-1 $\alpha$  ja IL-1 $\beta$ . Nämä proteiinit poikkeavat toisistaan molekyyllitasolla isoelektrisen pisteen osalta. IL-1-perheen kolmas jäsen on IL-1-RA. Se toimii IL-1:n spesifisenä vastavaikuttajana sitoutuen reseptoriin aiheuttamatta signaalia. IL-1 toimii endogeenisenä tulehduksen välittäjänä ja se osallistuu myös immuunivasteen säätelyyn vaikuttaen T- ja B-lymfosyyttien kasvuun ja erilaistumiseen. Kun IL-1:tä erittyy suuria määriä, se vaikuttaa systeemisesti aiheuttaen kuumetta, aktivoiden hypotalamus-aivolisäke-lisämunuais-akselia ja houkutellessa akuutin faasin proteiineja. Kun stimuloitujen solujen erittämät IL-1:tä pieniä määriä, se toimii paikallisesti autokriinisenä tai parakriinisenä välittäjäaineena. Tällöin se lisää ensin epäspesifistä tulehdusvastetta ja myöhemmin spesifistä immuunivastetta (Krakauer & Oppenheim 1998).

IL-1 reseptorin antagonisti (IL-1RN) on interleukiinien 1 $\alpha$  ja 1 $\beta$  spesifinen kilpaileva vastavaikuttaja. IL-1RN-pitoisuus säätelee IL-1 välitteistä viestintää vähentäen IL-1:n vaikutusta (Krakauer & Oppenheim 1998).

IL-6 on monitoiminen sytokiini, jolla on keskeinen rooli tulehdusvasteen muodostamisessa ja T-solujen erilaistumisessa hankitussa immuniteetissa. Ihmisellä IL-6 tuotetaan laajalti lisääntymiselimistössä ja sillä on tärkeä rooli implantaation säätelyssä ja istukan kehittämisessä. Se osallistuu myös sikiön hylkimisen estoon tähtäävään immuunivasteen adaptaatioon. Naisilla, joilla on esiintynyt toistuvia keskenmenoja, on havaittu endometriumissa IL-6-tuotannon olevan poikkeuksellisen vähäistä. Toisaalta myös systeemisesti kohonneen IL-6-pitoisuuden on todettu olevan yhteydessä naisella tuntemattomasta syystä johtuvaan infertiliteettiin. Kohonnut IL-6-pitoisuus estää CD4<sup>+</sup> T-solujen tuotantoa, mikä taas heikentää elimistön kykyä sietää raskautta (Prins ym. 2012).

TNF- $\alpha$  on proinflammatorinen sytokiini, jota tuottavat pääasiassa monosyytit, makrofagit ja lymfositit, mutta myös monet muut elimistön solut pystyvät sitä tuottamaan. Lähes kaikki elimistön solut voivat toimia TNF- $\alpha$ :n kohdesoluina. TNF- $\alpha$ :n vaikutus kohdesoluun välittyy spesifisen reseptorin välityksellä. TNF- $\alpha$  voi vaikuttaa kohdesoluun monin tavoin riippuen kohdesolusta ja siitä, minkälaisen solunsisäisen signaalireitin TNF- $\alpha$  kohdesolussa käynnistää. In vivo tutkimuksissa TNF- $\alpha$ :lla on

havaittu kaksi erityyppistä vaikutusta. Sen on havaittu liittyvän sekä patofysiologisiin prosesseihin että immuunivasteen kehittymiseen (Grell & Scheurich 1997 ).

Interferoni-gamma, IFN- $\gamma$ , on proinflammatorinen sytokiini, jota tuottavat pääasiassa aktivoituneet CD4 ja CD8- T-solut ja naturalkiller-solut. IFN- $\gamma$  toimii välittäjäaineena sekä luonnollisessa että hankitussa immuunivasteessa. Sen keskeisenä tehtävänä pidetään makrofagien aktivaatiota. IFN- $\gamma$  lisää myös monien proinflammatoristen sytokiinien, kuten IL-12, IL-15 ja TNF- $\alpha$  tuotantoa. IFN- $\gamma$  -aktiivisuus liittyy moniin inflammatorisiin- ja autoimmuunisairauksiin. IFN- $\gamma$ :lla on havaittu myös kudostuholta suojaavia anti-inflammatorisia vaikutuksia tiettyjen tulehdusten ja infektioiden yhteydessä (Mühl & Pfeilschifter 2003).

### 2.3 Tulehdusta hillitsevät sytokiinit

Anti-inflammatoriset sytokiinit estävät liian voimakasta tulehdusreaktiota ja siitä seuraavaa kudostuhoa. Ne vähentävät solujen kykyä tuottaa proinflammatorisia sytokiineja ja vaimentavat joidenkin proinflammatoristen sytokiinien vaikutusta niiden kohdesoluihin (Hedman ym. 2011).

IL-10 on monivaikutteinen sytokiini, joka säätelee useiden hematopoieettisten solujen toimintaa. Sen keskeisin tehtävä on inflammatorisen vasteen vähentäminen siten, että infektiivisen organismin hävittäminen mahdollisimman vähäistä kudostuhoa aiheuttaen helpottuu. IL-10 vaikuttaa myös immuunitoleranssiin, T-solujen ja CD-solujen kehittymiseen ja kasvuun ja B-solujen erilaistumiseen. Varhaiset kliiniset kokeet osoittavat, että IL-10:ta voitaisiin hyödyntää autoimmuuni- ja inflammatoristen sairauksien hoidossa (Moore ym. 2001) .

TGF- $\beta$  toimii reseptorivälitteisesti. Se hillitsee kohdesolujen kasvua sekä säätelee solujen fenotyyppiä ja adheesiota. Vähentynyt tai puuttuva TGF- $\beta$ -tuotanto voi johtaa fibroottisten tai hyperproliferatiivisten sairauksien kehittymiseen (Massague ym. 1992).

### 3 YLEISTÄ SYTOKIINEISTA LISÄÄNTYMISSÄ

Sytokiinit osallistuvat kiimakierron ja implantaation sekä lisääntymiselinten puolustusmekanismin säätelyyn. Tammalla, kuten muillakin nisäkkäillä steroidihormonit vaikuttavat munasarjojen, kohdun limakalvon, istukan ja sikiökalvojen toimintaan. Hormonit vaikuttavat myös näiden kudosten sytokiinitoimintaan. Steroidit eivät aina vaikuta suoraan sytokiineja tuottaviin soluihin, mikäli näillä ei ole riittävää määrää steroidihormonireseptoreita. Sen sijaan steroidihormonit voivat säädellä kohdesolujen sytokiinireseptoreiden määrää ja siten myös sytokiinien vaikutusta näihin soluihin (Kelly ym. 2001).

Ihmisellä on tehty lukuisia tutkimuksia sytokiinien merkityksestä yleisen lisääntymisfysiologian säätelyssä. Naisen munasarjoissa sytokiinien on todettu säätelevän follikkeleiden kehitystä, dominoivan follikkelin valikoitumista, ovulaatiota sekä keltarauhasen kehittymistä ja surkastumista (Field ym. 2013). Taulukkoon 2 on koottu eräiden sytokiinien tehtäviä naisen munasarjojen toiminnan säätelyssä.

Sytokiinien merkitystä emän ja alkion välisessä vuorovaikutuksessa on tutkittu useilla lajeilla. Sytokiinien uskotaan olevan merkittävässä osassa alkion suojaumisessa emän immunitetilta. Taulukkoon 3 on koottu ihmisellä eri kudoksissa todettuja maternaaliseen immunitettiin vaikuttavia sytokiineja (Aagaard-Tillery ym. 2006).

### 4 SYTOKIINIEN MERKITYS MUNASARJOISSA

Sytokiinit ovat tärkeitä munasarjansisäisiä säätelijöitä nisäkkäillä. Sytokiinien on havaittu säätelevän follikulogeneesiä, ovulaatiota ja keltarauhasen toimintaa. Munasarjoihin vaikuttavat sytokiinit ovat peräisin follikkelien thekasoluista, ovarien somaattisista soluista ja verenkierron mukana munasarjan stooman ekstravaskulaaritalaan tulleista immuunijärjestelmän soluista. Monien sytokiinien, kuten IFN- $\gamma$ :n, IL-6:n ja TNF- $\alpha$ :n on todettu kytkeytyvän munasarjan syklisiin tapahtumiin.



IL-1 puolestaan on useilla lajeilla keskeinen vaikuttaja munasarjassa kaikissa kiimakierron vaiheissa (Brännström 2003).

*Taulukko 2 Sytokiinien tehtäviä naisen munasarjojen toiminnan säätelyssä (Field ym. 2013).*

<b>sytokiini</b>	<b>Merkitys dominoivan follikkelin kasvussa ja valikoitumisessa</b>
IL-7	oosyytin maturaatio, granuloosasolujen apoptoosin supressio
IL-8	neutrofiilien kemotaksis, uuden verisuonituksen muodostuminen follikkeleiden ympärille
TNF- $\alpha$	granuloosasolujen proliferaatio, oosyytin apoptoosi, follikkelin apoptoosi ja atresia
	<b>merkitys ovulaatioon ja luteinisaatioon</b>
IL-1 $\beta$	verisuonten endoteelin kasvutekijän ilmentämisen induktio, leukosyyttien kemotaksis, granuloosasolujen siirtyminen proliferaatiosta differentaatioon,
TGF- $\beta$	solujen LH-vasteen muokkaaminen preovulatorisesta luteinisoivaan, kumuluksen lisääntyminen
TNF- $\alpha$	ekstrasellulaarimatriksin uudelleenmuokkaus, kollageenaasin säätely,

*Taulukko 3 Maternaaliseen immuniteettiin vaikuttavia sytokiineja ihmisellä (Aagaard-Tillery ym. 2006).*

<b>sytokiini</b>	<b>kudos</b>	<b>vaikutus</b>
IL-1	istukka, desidua, amnionneste	Äidin immuunivasteelta suojautuminen
TNF- $\alpha$	istukka, kohtu, amnionneste,	
IL-8	desidua, korion, amnion, amnionneste	
IL-2	trofoblasti, amnion	
IFN- $\gamma$	istukka, desiduan rauhaset	
TGF- $\beta$	istukka, desidua, sikiökalvot	äidin immuunivasteen heikentäminen
IL-10	istukka, desidua, amnion, amnionneste	
IL-6	istukka, desidua, korion, amnionneste	immuunivasteen voimistaminen

#### 4.1 Oosyyttien kypsymisen säätely

Useiden eri eläinlajien munasarjoissa tuotetaan IL-1: ä, sen kahta eri reseptoria (IL-1-R1 ja IL-1-R2) ja reseptorien antagonistia (IL-1-RA) (Gerard ym. 2004). Tammalla on tehty useita tutkimuksia IL-1-perheen sytokiiniin vaikutuksesta oosyyttien kypsymiseen munasarjoissa (Martoriati ym. 2002, Martoriati & Gérard 2003, Martoriati ym. 2003a, Martoriati ym. 2003b). Näiden tutkimusten tulokset ovat koottuna taulukkoon 4.

*Taulukko 4. IL-1-ryhmän sytokiinein tuotanto tamman oosyyteissä, kumulussoluissa ja granuloosasoluissa (Martoriati & Gérard 2003, Martoriati ym. 2003a, Martoriati ym. 2003b).*

	<b>oosyytit</b>	<b>kumulussolut</b>	<b>granuloosasolut</b>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	geeniä ei ilmennetä	ei tutkittu	ei tutkittu
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	geeniä ilmennetään.	geeniä ilmennetään, solun iällä tai kasvatusolosuhteilla ei vaikutusta geenin ilmentämiseen	geeniä ilmennetään, sytokiinin määrä follikulaarinsteessä muuttuu follikkelin maturaation aikana
<b>IL-1-R1</b>	geeniä ei ilmennetä	geeniä ilmennetään, solun ikääntyminen ja in vitro-kasvatus vaikuttaa negatiivisesti geenin ilmentämiseen	ei tutkittu
<b>IL-1-R2</b>	geeniä ilmennetään	geeniä ilmennetään, solun iällä tai kasvatusolosuhteilla ei vaikutusta geenin ilmentämiseen	geeniä ilmennetään, sytokiinin määrä follikulaarinsteessä pysyi vakaana follikkelin maturaation aikana
<b>IL-RA</b>	geeniä ilmennetään	geeniä ilmennetään, solun ikääntyminen ja in vitro-kasvatus vaikuttaa negatiivisesti geenin ilmentämiseen	geeniä ilmennetään, sytokiinin määrä follikulaarinsteessä muuttuu follikkelin maturaation aikana

Martoriati ym. (2002) ovat tutkineet IL-1-systeemin geenien ilmenemistä hevosen kumulus-oosyyttikompleksissa ja IL-1 $\beta$ :n merkitystä oosyyttien kypsymiseen viljelyolosuhteissa. Tutkimuksen taustalla oli oletus, että IL-1-systeemillä olisi

merkitystä hevosen oosyyttien kypsymiseen. Hevosella oosyytit kypsyvät erilaisissa olosuhteissa kuin monilla muilla kotieläinlajeilla. Muista lajeista poiketen ovulaation aikaan veren LH-pitoisuus on koholla useamman päivän ajan. Pitoisuus on korkeimmillaan noin vuorokausi ovulaation jälkeen. Muista kotieläimistä poikkeavat olosuhdevaatimukset ilmenevät myös hevosen oosyyttien *in vitro* kasvatuksessa. Hevosen alkiot kypsyvät huonosti samanlaisissa viljelyolosuhteissa kuin naudan alkioita kasvatetaan. Näin ollen voidaan olettaa, että hevosen alkioiden kypsyminen vaatii erityisiä lajispesifisiä mekanismeja.

Martoriati ym. (2002) tekemässä tutkimuksessa selvisi, että sekä IL-1 $\beta$ - että IL-1-R2-geenien ilmentämistä tapahtui hevosen oosyytissä sen kypsymisasteesta ja kunnosta riippumatta. Tämä viittaa siihen, että kyseiset sytokiinit osallistuvat oosyyttien autokriiniseen säätelyyn tai oosyyttien ja kumulussolujen parakriiniseen säätelyyn. Kumulussolut voivat IL-1RA tuotannon avulla säädellä IL-1-välitteistä tulehdusprosessia ja siten vaikuttaa oosyytin maturaatioon. Tutkimuksessa huomattiin myös, että IL-1 $\beta$ :n transkriptio oli suurempaa *in vivo* kypsyneillä preovulatorisilla oosyyteillä kuin *in vitro* kypsyneillä (Martoriati ym. 2002). On mahdollista että muutkaan viljelyolosuhteissa saadut tulokset eivät täysin vastaa todellista tilannetta.

IL-geenien ilmentymisessä on eroja lajien välillä. Kol ym. (1999) ja Gerwin ym. (1995) tekemissä tutkimuksissa rotalla ja hiirellä on todettu oosyyteillä IL-1 $\beta$  ilmentymistä, kun taas De los Santos ym. (1998) tutkimuksessa ihmisellä IL-1 $\beta$  ilmentymistä ei havaittu. Rotilla tehdyssä tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu IL-1-reseptorin geenin ilmentymistä kuten hevosella. Erot tuloksissa voivat selittyä eroavilla tutkimusmenetelmillä tai todellisella erolla lajien välillä.

IL-1 $\beta$  inhiboi keltarauhashormonin aikaansaamaa oosyyttien maturaatiota viljelyolosuhteissa tehdyssä tutkimuksessa. Inhiboivaa vaikutusta tutkittiin lisäämällä IL-1  $\beta$  -pitoisuutta oosyyttien kasvualustalla. IL-1  $\beta$  välitteisen oosyyttien maturaation inhibition todettiin olevan annosriippuvaista. Suuremmalla pitoisuudella inhiboiva vaikutus lisääntyi (Martoriati ym. 2003a). Näin ollen IL-1 $\beta$  tuotantoa vähentämällä tai sen toimintaa estämällä voitaisiin nopeuttaa oosyytin kypsymistä. IL-1-reseptoriantagonistin lisääminen kasvualustalle inhiboi IL-1  $\beta$ : n vaikutusta (Martoriati ym. 2003a). Voidaan siis olettaa, että IL-1  $\beta$  toimii reseptorivälitteisesti.

Tutkimusten perusteella huomataan, että oosyyttien IL-1-geenien ilmentymisessä on lajikohtaisia eroja. Koska hevosen oosyyteissä IL-1-R2:n geeni on aktiivinen, oosyytin solut toimivat IL-1:n kohdesoluina. Eroa *in vivo* ja *in vitro* kasvaneiden oosyyttien IL-1 $\beta$ -tuotannossa ei ole muilla lajeilla tutkittu. Martoriati ym. (2002) tutkimuksessa havaittiin, että hevosen oosyytit selviävät ja kypsyvät heikosti *in vitro* kasvatuksessa. Heikentynyt kasvu ja degeneraatio saattavat selittää myös alentuneen IL-1 $\beta$ -tuotannon.

IL-1 $\beta$ :n ja IL-1RA:n vaikutuksia cumulus-oosyytti-kompleksin maturaatioon *in vivo* tutkittiin injektoimalla kyseisiä proteiineja intrafollikulaarisesti preovulatorisiin follikkeleihin. IL-1 $\beta$ :n intrafollikulaari-injektio kiihdytti cumulus-oosyytti-kompleksin maturaatiota ja ovulaatioprosessia, mutta IL-1RA:n lisäämisellä ei tutkimuksessa ollut vaikutusta maturaatioon tai ovulaatioon (Martoriati ym. 2003b). *In vivo* ja *in vitro* tutkimusten tulokset ovat keskenään ristiriitaiset. Kuten jo aiemmin mainittiin, hevosen oosyytit selvisivät huonosti viljelyolosuhteissa. Tämä on otettava huomioon myös tulosten luotettavuutta arvioitaessa. *In vivo* menetelmän epävarmuustekijä on intrafollikulaarinen injektio ja sen aikaansaamat vaikutukset. On mahdollista että injektion aiheuttama trauma on vaikuttanut oosyytin maturaatioon injektoitavan aineen lisäksi. Mikäli *in vivo* menetelmää pidetään luotettavampana, voidaan olettaa tulehdusytokiinien nopeuttavan follikkelin kypsymistä ja ovulaatiota. Näin ollen myös siemennyksen aiheuttama kohtutulehdus saattaisi parakriinisesti nopeuttaa oosyytin kypsymistä ja parantaa siten tiinehtymisen mahdollisuutta.

Martoriati ym. (2002) tutkivat myös hevosen oosyyttiä ympäröivien kumulussolujen geeniekspressiota. Hevosen kumulussoluissa tapahtuu IL-1 $\beta$ :n, IL-1-reseptoriantagonistin, IL-1-R1:n ja IL-1-R2:n transkriptiota. Näiden geenien transkriptiota on tutkittu myös rotalla (De Los Santos ym. 1998, Kol ym. 1999a, Kol ym. 1999b) ja ihmisellä (De Los Santos ym. 1998). Tulokset ovat olleet vastaavia kuin hevosella IL-1 $\beta$ :n, IL-1-RA:n ja IL-1-R1:n osalta. IL-1-R2:n geeniekspressiota ei ole ihmisellä tutkittu, ja rotalla tehdyssä tutkimuksessa kyseisen geenin ekspressiota ei todettu. Eroa eri-ikäisten ja *in vivo* ja *in vitro*-kasvaneiden kumulussolujen IL-1-ryhmän geenien ilmentämisessä ei ole tutkittu muilla lajeilla kuin hevosella.

IL-1 $\beta$  ja IL-1-R2-geeniekspressioon eivät vaikuttaneet oosyyttien ja kumulussolujen ikä tai tapahtuiko kasvatus in vivo- vai in vitro-olosuhteissa. Sen sijaan IL-1-R1:n ja IL-1-RA:n geenien transkriptio väheni huomattavasti oosyyttien ja kumulussolujen vanhetessa ja transkriptio oli suurempaa in vivo-olosuhteissa. Yllämainituista eroista huolimatta kumulussolut laajenivat normaalisti sekä in vivo että in vitro kasvatuksessa (Martoriati ym. 2002). Tämä tutkimus osoittaa, että kyseisillä IL-1-ryhmän proteiineilla ei ole suoraa vaikutusta kumulussolujen laajenemiseen.

IL-1 $\beta$ :n, IL-1-RA:n ja IL-1-reseptori-2:n genejä ilmennetään myös hevosen granuloosasoluissa. Martoriati ym. (2003) selvittivät tutkimuksessaan IL-1-systeemin geenien ilmentymistä hevosen granuloosasoluissa ja follikulaarinesteessä follikkelin maturaation aikana. Tutkimuksessa kerättiin follikulaarinestettä dominoivasta follikkelista preovulatorisessa maturaatiovaiheessa säännöllisin väliajoin ovulaation induktion jälkeen. Tutkimuksessa selvisi, että IL-1 $\beta$ :n ja IL-1-RA:n mRNA:n pitoisuus muuttui follikkelin kypsyessä. IL-1-R2:n mRNA:n pitoisuus pysyi vakaana. Follikulaarinesteen IL-1 $\beta$ -pitoisuus aaltoili muutaman tunnin ovulaation induktion jälkeen. Tutkimuksen tekijät epäilevät IL-1 $\beta$ -ekspression granuloosasoluissa ja sytokiinin pitoisuuden follikulaarinesteessä olevan gonatotropiinien säätelmää ja IL-1 $\beta$ :n olevan yksi ovulaatiota säätelvä parakriininen tekijä (Martoriati & Gérard 2003).

#### 4.2 Keltarauhasen kehityksen säätely

Tammalla on tutkittu sytokiinien TNF- $\alpha$  ja IFN- $\gamma$  vaikutusta keltarauhasen kehitykseen ja surkastumiseen (Galvão ym. 2011). Tutkimusta varten otettiin veri- ja keltarauhasnäytteitä satunnaisesti valituilta sykleoilta tammoilta teurastuksen jälkeen. Tutkimuksessa todettiin sekä TNF- $\alpha$ :aa että IFN- $\gamma$ :tä esiintyvän tamman keltarauhasessa. Näiden sytokiinien oletetaan osallistuvan tamman keltarauhasen kehittymiseen ja luteolyysiin autokriinisinä ja parakriinisinä säätelijöinä. Varhaisessa luteaalivaiheessa TNF- $\alpha$  säätlee keltarauhasen kasvua ja eritystoimintaa. Myöhemmässä luteaalivaiheessa TNF- $\alpha$  yksin tai yhdessä IFN- $\gamma$ :n kanssa edistävät PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  synteesiä ja rajoittavat keltarauhasen solujen elinkykyisyyttä (Galvão ym. ).

TNF- $\alpha$  voi aikaansaada joko solujen proliferaatiota tai solukuolemaan riippuen siitä minkä tyyppiseen reseptoriin se sitoutuu. Vaikutukset tamman keltarauhasessa riippuvat

myös keltarauhasassa vaikutushetkellä olevista reseptoreista. Tamman keltarauhasessa esiintyy kahta erilaista TNF- $\alpha$  -reseptoria: tyypin I ja tyypin II reseptoreita. Keltarauhasen alku- ja keskivaiheessa siellä esiintyy enemmän tyypin II reseptoreita, mikä viittaa siihen, että TNF- $\alpha$  -proteiinin sitoutuminen tyypin II reseptoriin lisää keltarauhasen kasvua. Sen sijaan proteiinin sitoutuminen tyypin I reseptoriin johtaa tapahtumaketjuun, joka päättyy solun apoptoosiin. Tyypin I reseptoreita syntetisoidaan keltarauhassoluihin sen surkastumisvaiheessa. TNF- $\alpha$  -proteiinin synteesi on suurimmillaan keltarauhasen keski- ja surkastumisvaiheessa (Galvão ym. ).

Sekä IFN- $\gamma$  -proteiinin että sen reseptorin synteesi keltarauhasessa lisääntyy huomattavasti keltarauhasen surkastumisvaiheessa. IFN- $\gamma$ -mRNA molekyylejä syntetisoidaan jo keltarauhasen keskivaiheessa, millä saattaa olla vaikutusta lisääntyneeseen IFN- $\gamma$  -proteiinin synteisiin myöhemmässä vaiheessa. TNF- $\alpha$  stimuloi progesteroni ja prostaglandiini E<sub>2</sub> tuotantoa ja inhiboi prostaglandiini F<sub>2 $\alpha$</sub>  tuotantoa keltarauhassoluissa varhaisessa keltarauhasvaiheessa. Koska IFN- $\gamma$  -pitoisuus on tässä vaiheessa hyvin matala, sillä ei uskota olevan merkitystä varhaisen keltarauhasvaiheen eritystoimintaan. Myöskään In Vitro kokeissa IFN- $\gamma$ :n täydellisellä puuttumisella ei ollut merkitystä keltarauhassolujen eritystoimintaan. Myöhemmissä vaiheissa TNF- $\alpha$ :n vaikutus prostaglandiini F<sub>2 $\alpha$</sub>  tuotantoon muuttuu, mutta tarkkaa mekanismia tähän ei tiedetä (Galvão ym. 2012 ).

Tiineyden säilymisen kannalta on tärkeää, että keltarauhasiin ei syntetisoida tyypin I reseptoreita, mikä johtaisi keltarauhasen surkastumiseen. Tutkimus ei pysty varmuudella selvittämään tarkkaa viestintämekanismia, joka johtaa reseptorityyppien muutokseen. Tämän tutkimuksen perusteella voitaisiin kuitenkin päätellä tapahtumasarjan olevan seuraavanlainen. TNF- $\alpha$  pitoisuus lisääntyy keltarauhasen keski- ja surkastumisvaiheessa ja tämä vaikuttaa hormonituotantoon. PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  synteesi lisääntyy. Kuten jo aiemmin on todettu, hormonit voivat vaikuttaa sytokiinireseptoreiden määrään. Tässä tapauksessa PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  saattaa lisätä tyypin I reseptoreiden määrää. Tällöin solujen reaktio TNF- $\alpha$ :lle muuttuu proliferaatiosta apoptoosiksi. Tämän mekanismin tarkka selvittäminen vaatii jatkotutkimuksia.

## 5 SYTOKIINIEN MERKITYS ENDOMETRIUMISSA

Tamman endometriumien sytokiinituotannosta on tehty useita tutkimuksia, joiden päämääränä on selvittää endometriumien tulehdusvasteen säätelyä sekä infektiivisessä että siemennyksen jälkeisessä endometriitissa.

Bakteerin aiheuttamia kohtutulehduksia esiintyy tammalla sekä veneerisen tartunnan seurauksena, kroonisena persistoivana infektionä että ohimenevänä siemennyksen tai astutuksen jälkeisenä infektionä. Veneerinen tartunta tapahtuu oriin levittäessä patogeena tammalta toiselle. Tällöin tamman yksilöllisellä alttiudella ei ole infektoriskin kannalta suurta merkitystä (Troedsson 1999).

Krooniseen persistoivaan infektiin liittyy yleensä tamman alttius, kuten anatominen häiriö tai kohdun vähentynyt eritystoiminta. Siemennyksen tai astutuksen jälkeisissä tulehduksissa aiheuttaja on yleensä genitaalialueen kommensaali patogeeni. Infektio on yleensä ohimenevä, mutta vastustuskyvyttömillä tammoilla infektio voi pitkittyä huomattavasti (Troedsson 1999). Normaalisti siemennyksen jälkeisen tulehdusreaktion aiheuttaa ennemminkin sperma kuin bakteerit. Bakteereja siirtyy astutuksen tai siemennyksen yhteydessä melko vähän ja ne eliminoituvat normaalilla tammalla nopeasti (Kotilainen ym. 1994).

Kohdun eritteet heikentävät siittiöiden liikkuvuutta, mutta munanjohtimeen asti päässeet siittiöt ovat suojassa kohdun eritteiltä. Vaikutus on voimakkaimmillaan noin 12 tuntia siemennyksen jälkeen, jolloin siemennyksen indusoima endometriitti myös on huipussaan. Sperman eliminointiin vaikuttavat pääasiassa leukosyytit. Leukosyyttien pitoisuudella ei kuitenkaan todettu olevan vaikutusta siittiöiden eliminaatioon. Leukosyytit tarttuvat siittiöihin reseptoriensa avulla. Osa siittiöistä pystyy kuitenkin irrottautumaan neutrofiilista ja jatkamaan kulkuaan (Alghamdi ym. 2001). Normaaleilla tammoilla kohtu puhdistuu alle kahdessa vuorokaudessa. (Katila 1996) Siemennettäessä joka toinen päivä edellisten kertojen indusoima tulehdus ei vaikuta siittiöiden liikkuvuuteen jälkimmäisillä kerroilla. Sen sijaan tammoilla, joilla siemennyksen jälkeinen endometriitti on pitkittynyt, tulehdus vaikeuttaa siittiöiden säilymistä myöhemmillä siemennyskerroilla (Alghamdi ym. 2001).

## 5.1 Endometriumin tulehdusvasteen säätely

Akuutin faasin vaste endometriitissa säättyy pääasiassa sytokiinien perusteella (Jensen & Whitehead 1998). Endometriumissa tapahtuvaa sytokiinien IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 ja IL-10 sekä seerumin amyloidi -A:n (SAA) tuotantoa ja systeemistä akuutin faasin vastetta infektiivisen endometriitin aikana on tutkittu kuudella tammalla (Mette ym. 2010b). SAA on akuutin faasin proteiini, jonka pitoisuus systeemissä verenkierrassa nousee proinflammatoristen sytokiinien vaikutuksesta (Jensen & Whitehead 1998). Tutkimuksessa seurattiin endometriumissa tapahtuvaa sytokiinien geeniekspressiota kohdusta otettujen koepalojen avulla ja akuutin faasin vastetta verinäytteiden avulla. Koepaloja otettiin ennen infektointia ja 3, 12, 24, 48 ja 72 tuntia infektoinnin jälkeen (Mette ym. 2010a).

Kokeellisesti aiheutetun infektiivisen E-coli-endometriitin jälkeen tutkittujen tammojen endometriumissa havaittiin kaikkien tutkittujen sytokiinien tuotannon lisääntyneen. Tuotanto oli suurimmillaan 3 tuntia infektoinnin jälkeen. SAA-, IL-1 $\beta$ - ja IL-8 tuotanto palautui lähelle infektointia edeltänyttä tilaa 12 ja 48 tunnin sisällä. IL-10- ja TNF- $\alpha$  – sytokiinien tuotanto oli koholla vielä 72 tunnin kukuttua infektoinnista (Mette ym. 2010a).

Sekä tämän että seuraavaksi esitettyjen tutkimusten epävarmuustekijänä on lukuisten koepalojen ottamisen ja niiden yhteydessä instrumenttien kohtuun viemisen aiheuttamat tulehdusmuutokset. Yksi jatkotutkimuksen kohde olisi koepalojen ottamisen vaikutus endometriumin sytokiinituotantoon. Mikäli pelkästään koepaloja ottamalla saadaan endometriumin sytokiinituotantossa aikaiseksi merkittäviä muutoksia, on se huomioitava useiden tutkimusten tuloksia tulkittaessa.

Veren SAA-pitoisuuden havaittiin olevan huomattavasti koholla 24 ja 48 tuntia infektoinnin jälkeen otetuissa näytteissä, mutta se palasi lähtötasolle 96 tuntia infektoinnin jälkeen otetussa näytteessä. Seerumin fibrinogeenipitoisuus noudatti samankaltaista mallia kuin SAA, mutta pitoisuus oli yhä koholla viimeisessä 120 tunnin näytteessä. Seerumin rautapitoisuus laski normaalitasosta 12 ja 24 tunnin kohdalla otetuissa näytteissä ja oli palannut normaalitasolle 36 tunnin kuluttua. Kolme tuntia infektoinnin jälkeen verinäytteissä havaittiin huomattavaa leukopeniaa (Mette ym. 2010a).



SAA-pitoisuuden nousua on tutkittu myös siemennyksen jälkeisen endometriitin yhteydessä normaaleilla terveillä ponitammoilla. Tutkimuksessa selvitettiin immuunireaktiota pakastespermalla siemennetyillä tammoilla 24 tuntia siemennyksen jälkeen otetuista näytteistä. Kontrolliryhmänä oli pelkällä sperman laimentimella siemennettyjä tammoja. SAA-pitoisuus systeemisessä verenkierrossa ei noussut siemennyksen seurauksena (Nash ym. 2010) .

Nämä tutkimukset osoittavat, että bakteeriperäinen kohtutulehdus aiheuttaa systeemisen tulehdusvasteen ja siten verenkierron välityksellä leukosyyttien kulkeutumisen muualta elimistöstä kohtuun. Sen sijaan siemennys aiheuttaa vain paikallisen tulehdusvasteen kohdussa. Terveellä tammalla tulehdusarvojen kohoaminen verinäytteessä siemennyksen jälkeen ei selity fysiologisella endometriitillä vaan viittaa mahdolliseen bakteeri-infektioon, joka voi olla seurausta puutteellisesta siemennyshygieniasta.

## 5.2 Endometriumien sytokiinituotannon erityispiirteet pitkittyneelle siemennyksen jälkeiselle kohtutulehdukselle herkällä tammoilla

Tammalla siemennystä seuraa aina kohdun tulehdusreaktio. Sekä luonnollisessa astutuksessa että keinosiemennyksessä sperma päätyy suoraan kohtuun, jolloin siittiöt, siemennesteen komponentit ja mahdolliset bakteerit aiheuttavat kohdun tulehdusreaktion. Tulehduksen tarkoituksena on puhdistaa kohtu ylimääräisistä siittiöistä, siemennesteestä, kontaminanteista ja tulehduksen sivutuotteista. Tulehdukselle tyypillistä on neutrofiilien infiltraatio kohdun luumeniin. Neutrofiilit fagosytoivat siittiöitä ja bakteereja ja tuottavat sytokiineja, jotka aikaansaavat kohdun lihaskerroksen supistuksia. Supistukset puhdistavat mekaanisesti kohtua sekä kohdun kaulan että imuteiden kautta. Normaalisti kohtu on puhdistunut kahden vuorokauden kuluttua siemennyksestä. Tulehduksen pitkittyminen voi saada aikaan ennenaikaisen luteolyysin, joka johtaa alkion menetykseen (Troedsson ym. 2001). Tammoilla, jotka ovat alttiita persistoivalle siemennyksen jälkeiselle kohtutulehdukselle, varhaisia alkionmenetyksiä tapahtuu kolme kertaa enemmän kuin normaaleilla tammoilla (katsauksessa Maischberger ym. 2008) .

Normaalien tammojen ja pitkittyneelle kohtutulehdukselle herkkien tammojen endometriumissa tapahtuvasta sytokiinituotannosta on tehty vertailevia tutkimuksia. Fumuso ym. (2003) vertailivat IL-1 $\beta$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$  sytokiinien mRNA:n ilmentymistä normaalien ja herkkien tammojen endometriumista otetuista biopsioista. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kiimakierron, keinosiemennyksen ja immunomodulaattorien vaikutusta pro-inflammatoristen sytokiinien tuotantoon normaaleilla ja herkillä tammoilla. Vuonna Fumuso ym. (2007) tekivät jatkotutkimuksen aiheesta. Tässä jälkimmäisessä tutkimuksessa selvitettiin sytokiinien IL-8 ja IL-10 tuotantoa sekä MHC-II:n, T-lymfosyytteihin ja neutrofiileihin perustuvaa immuunivastetta normaaleilla ja herkillä tammoilla. Lisäksi tutkittiin keinosiemennyksen ja immunomodulaattorien vaikutusta immuunivasteeseen.

#### 5.2.1 Kiimakierron vaikutus sytokiinituotantoon

Tutkimuksessa havaittiin herkkien tammojen tuottavan normaaleja tammoja enemmän proinflammatorisia sytokiineja endometriumissaan. Herkillä tammoilla sytokiinien tuotannossa oli vaihtelua estruksen ja diestruksen välillä. Erityisesti sytokiinien IL-6 ja TNF- $\alpha$  tuotanto lisääntyi herkillä tammoilla estruksen aikana. Normaaleilla tammoilla sytokiinituotannossa ei ollut merkittäviä eroja estruksen ja diestruksen välillä (Fumuso ym. 2003) (Fumuso ym. 2007). Tulokset ovat esiteltynä kuvaajassa 1.

Tämä tutkimus viittaa siihen, että herkillä tammoilla ei ole pelkästään ylimitoitettu vaste siemennykseen vaan niillä on jo valmiiksi kiiman aikaan lisääntynyt tulehdusvälittäjäaineiden tuotanto.

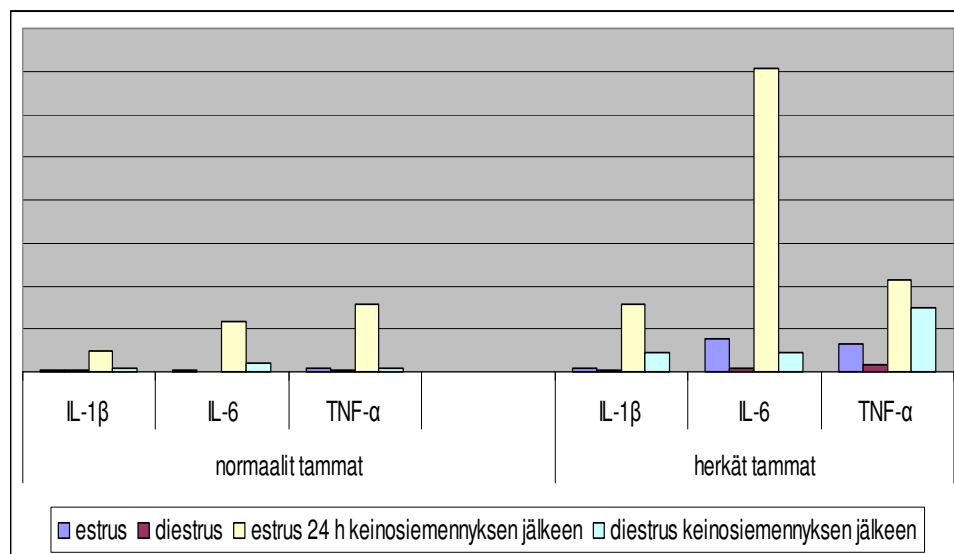
#### 5.2.2 Keinosiemennyksen vaikutus sytokiinituotantoon

Keinosiemennys tapetuilla siittiöillä lisäsi sytokiinien IL-1 $\beta$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$  tuotantoa estruksen aikana sekä normaaleilla että herkillä tammoilla. Herkillä tammoilla näiden sytokiinien tuotanto lisääntyi enemmän kuin normaaleilla tammoilla. Huomattavin ero oli IL-6 tuotannossa. Herkät tammat tuottivat keskimäärin yli kuusi kertaa enemmän sytokiinia IL-6 endometriumissaan kuin normaalit tammat. Normaaleilla tammoilla keinosiemennyksellä ei ollut merkittävää vaikutusta proinflammatoristen sytokiinien tuotantoon diestruksen aikana. Herkillä tammoilla sytokiinien IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  tuotanto

säilyi suurena keinosiemennystä seuraavan diestruksen aikana (Fumuso ym. 2003). Tulokset ovat esitettyinä kuvaajassa 1.

Kohonneilla tulehdussytokiinipitoisuuksilla saattaa olla parakriinisiä vaikutuksia myös ympäröivissä kudoksissa. TNF- $\alpha$  pitoisuuden lisääntyminen munasarjoissa liittyy keltarauhasen surkastumiseen (Galvão ym. 2012). Huomattavan korkea TNF- $\alpha$  pitoisuus kohdussa diestruksen aikana saattaisi parakriinisesti vaikuttaa munasarjoissa johtaen keltarauhasen ja mahdollisen tiineyden menettämiseen.

*Kuvaaja 1. Sytokiinien IL-1 $\beta$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$  tuotanto normaaleilla ja herkällä tammoilla estruksen ja diestruksen aikana ilman keinosiemennystä ja 24 tuntia keinosiemennyksen jälkeen sekä siemennystä seuraavan diestruksen aikana (Fumuso ym. 2003).*

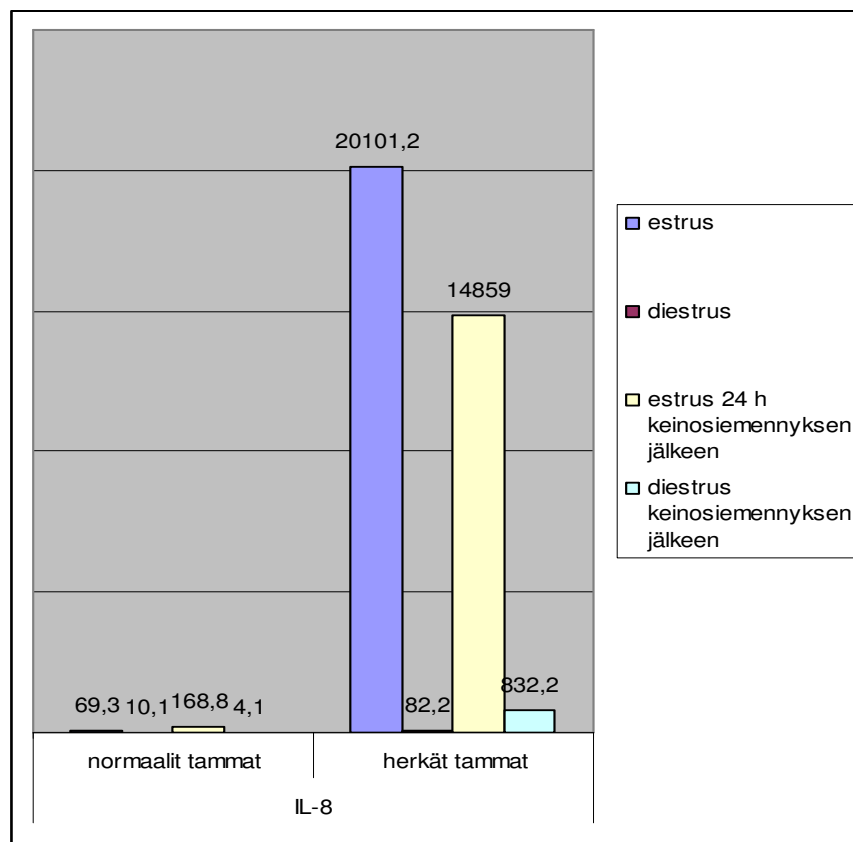


Myöhemmässä tutkimuksessaan Fumuso ym. (2007) selvittivät sytokiinien IL-8 ja IL-10 tuotantoa herkällä ja normaaleilla tammoilla estruksen ja diestruksen aikana, sekä keinosiemennyksen vaikutusta näiden sytokiinien tuotantoon. Herkillä tammoilla IL-8 tuotanto kasvoi huomattavasti estruksen aikana sekä siemennyksen yhteydessä että kiimassa, johon ei siemennetty. Kiiman aikana IL-8 tuotanto oli herkällä tammoilla lähes 300-kertainen normaaleihin tammoihin verrattuna. Keinosiemennys vaikutti hieman vähentävän IL-8 tuotantoa herkällä tammoilla, mutta siemennyksen jälkeisessä

diestruksessa sytokiinin tuotanto jäi aiempaa diestrusta korkeammaksi. Normaaaleilla tammoilla keinosiemennys lisäsi IL-8 tuotantoa, mutta tuotanto väheni siemennystä seuraavassa diestruksessa aiempaa diestrusta pienemmäksi. Tulokset ovat esitettynä kuvaajassa 2.

Tämän tutkimuksen perusteella IL-8 on selkeä indikaattorisytokiini normaalien ja herkkien tammojen välillä. Myös tämä tutkimus viittaa siihen, että herkällä tammoilla pelkkä kiima aiheuttaa tulehdusvälittäjäaineiden lisääntymisen, jolloin kyseessä ei ole ylimitoitettu vaste siemennykseen.

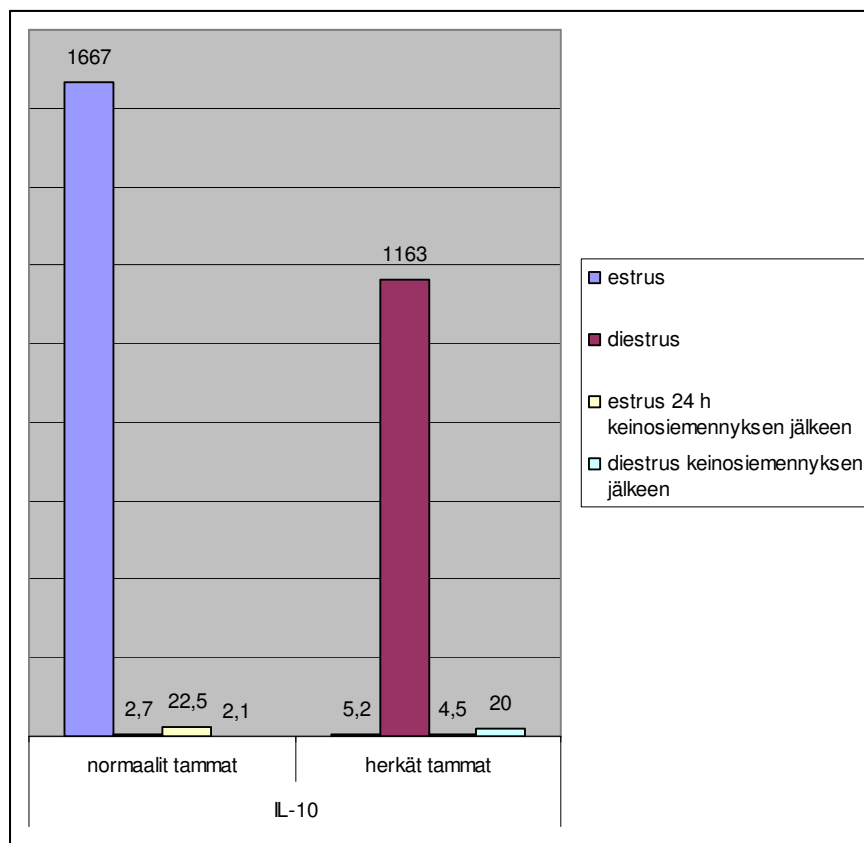
*Kuvaaja 2. Sytokiinin IL-8 tuotanto estruksen ja diestruksen aikana ilman keinosiemennystä ja 24 tuntia keinosiemennyksen jälkeen sekä siemennystä seuraavan diestruksen aikana. Kuvaajassa esitetyt lukuarvot ovat keskiarvoja kunkin sytokiinin mRNA-tuotannosta (Fumuso ym. 2007).*



Normaaaleilla tammoilla sytokiinin IL-10 tuotanto endometriumissa on selvästi lisääntynyt estruksen aikana ja tuotanto on vähäistä diestruksen aikana kun taas

pitkittyneelle siemennyksenjälkeiselle kohtutulehdukselle herkillä tammoilla tilanne on päinvastainen. Siemennyksen jälkeen erot normaalien ja herkkien tammojen välillä vähenevät (Fumuso ym. 2007). Tulokset ovat esiteltynä kuvaajassa 3. Vaikka IL-10 tuotannossa kiimakierroksen aikana on merkittäviä eroja ryhmien välillä sen merkitys tiineyden kannalta saattaa olla vähäinen.

*Kuvaaja 3. Sytokiinin IL-10 tuotanto estruksen ja diestruksen aikana ilman keinosiemennystä ja 24 tuntia keinosiemennyksen jälkeen sekä siemennystä seuraavan diestruksen aikana. Kuvaajassa esitetyt lukuarvot ovat keskiarvoja kunkin sytokiinin mRNA-tuotannosta (Fumuso ym. 2007).*



Woodward ym. (2013) profiloivat pro- ja anti-inflammasosten sytokiinin IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, IFNG, TNF- $\alpha$  ja IL-10 mRNA:n ilmentymistä ja neutrofiilien määrää tamman endometriumissa vuorokauden sisällä keinosiemennyksestä. Näytteitä otettiin juuri ennen siemennystä, sekä 2, 6, 12, ja 24 tuntia siemennyksen jälkeen. Tutkimukseen osallistuvat tammat jaoteltiin kahteen ryhmään sen mukaan olivatko tammat alttiita pitkittyneelle siemennyksenjälkeiselle kohtutulehdukselle vai eivät.

Tutkimuksessa selvisi, että pitkittyneelle kohtutulehdukselle herkillä tammoilla neutrofiilien määrä endometriumissa oli verrokkiryhmään nähden korkeampi kaikilla tutkimushetkillä siemennyksen jälkeen. Molemmilla ryhmillä neutrofiilien määrä oli korkeimmillaan kuusi tuntia siemennyksen jälkeen.

IL-1RN tuotanto normaaleilla tammoilla kohosi kuusi tuntia siemennyksen jälkeen otetussa näytteessä huomattavasti korkeammaksi kuin herkillä tammoilla. 2, 12 ja 24 tuntia siemennyksen jälkeen otetuissa näytteissä normaaleilla tammoilla tuotanto ei merkittävästi eronnut siemennystä edeltävästä tuotannosta. Herkillä tammoilla määrä oli koholla kaikilla tutkimuskerroilla siemennyksen jälkeen, mutta ei noussut yhtä korkeaksi kuin normaaleilla tammoilla.

IFNG tuotanto lisääntyi normaaleilla tammoilla jo kahden tunnin kuluttua ja oli korkeimmillaan kuuden tunnin kuluttua siemennyksestä. Määrä nousi suuremmaksi kuin herkillä tammoilla, joilla määrä oli koholla vasta kuuden tunnin kuluttua siemennyksen jälkeen.

Tutkimuksessa todetut erot sytokiinin IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 ja TNF- $\alpha$  tuotannossa tammojen endometriumissa ovat esiteltynä taulukossa 5. Taulukossa on verrattu Woodward ym. (2013) tekemän tutkimuksen tuloksia Fumuso ym. (2003 ja 2007) tekemien tutkimusten tuloksiin. Tuloksia verratessa on huomioitava, että Fumuson ym. (2003 ja 2007) tekemissä tutkimuksissa vertailunäyte (estrusnäyte ennen siemennystä) on otettu jo edeltävän estrussyklin aikana ja estrusnäytteitä siemennyksen jälkeen on otettu vain yhdellä ajanhetkellä, 24 tuntia siemennyksen jälkeen kun taas Woodward ym. (2013) tekemissä tutkimuksessa vertailunäyte otettiin saman estruksen aikana juuri ennen siemennystä ja estrusnäytteitä siemennyksen jälkeen on otettu useana eri ajankohtana; 2,6,12 ja 24 tuntia siemennyksen jälkeen. Jälkimmäisessä tutkimuksessa

*Taulukko 5. Endometriumien sytokiinituotanto normaaleilla ja siemennyksenjälkeiselle pitkittyneelle kohtutulehdukselle herkillä tammoilla ennen estruksen aikana siemennystä ja 24 tuntia siemennyksen jälkeen. Taulukossa on vertailtu kahden eri tutkimuksen tuloksia (Fumuso ym. 2003, Fumuso ym. 2007, Woodward ym. 2013).*

	Fumuso ym 2003 ja 2007		Woodward y. 2013	
	normaalit tammat	herkät tammat	normaalit tammat	herkät tammat
IL-1β	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys lisää hieman tuotantoa.	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys lisää tuotantoa enemmän kuin normaaleilla tammoilla.	Ryhmiä välillä ei merkittävää eroa. Tuotanto nousee 2 ja 6 h siemennyksen jälkeen, mutta 24 h kuluttua laskenut lähtötasolle.	
IL-6	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys lisää hieman tuotantoa.	Tuotanto estruksessa suurempaa kuin normaaleilla tammoilla. Siemennys lisää huomattavasti tuotantoa.	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys lisää hieman tuotantoa.	Tuotanto estruksessa aavistuksen suurempaa kuin normaaleilla tammoilla. Siemennys lisää tuotantoa huomattavasti normaaleihin tammoihin verrattuna. Tuotanto suurimmillaan 6 h ja palautunut lähtötasolle 24 h siemennyksestä.
IL-8	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys ei vaikuta tuotantoon.	Tuotanto suurta estruksessa. Siemennys laskee hieman tuotantoa.	Ennen siemennystä normaaleilla tammoilla tuotanto suurempaa kuin herkillä tammoilla. Tuotanto lisääntyy molemmilla siemennyksen jälkeen ja 24 h siemennyksestä tuotanto palautunut lähtötasolle.	
IL-10	Tuotanto suurta estruksessa. Siemennys laskee tuotantoa.	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys ei vaikuta tuotantoon.	Tuotanto vähäistä estruksessa. 6 h siemennyksestä tuotanto kohoaa huomattavasti, 24 h palannut lähtötasolle.	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys ei nosta tuotantoa yhtä paljon kuin normaaleilla tammoilla. 24 h siemennyksestä tuotanto lähtötasolla.
TNF-α	Tuotanto vähäistä estruksessa. Siemennys lisää hieman tuotantoa.	Tuotanto estruksessa suurempaa kuin normaaleilla tammoilla. Siemennys lisää tuotantoa.	Tuotanto estruksessa melko vähäistä. Tuotanto lisääntyy huomattavasti siemennyksen jälkeen ollen suurimmillaan 6 h ja lähtötasolla 24h siemennyksestä.	Tuotanto estruksessa samalla tasolla kuin normaaleilla tammoilla. 6 h siemennyksestä tuotanto nousee vähemmän kuin normaaleilla. 24 h siemennyksestä tuotanto lähellä lähtötasoa, mutta suurempi kuin normaaleilla.

merkittävimmät muutokset sytokiinien toutannossa saatiin 2 ja 12 tunnin välillä ja 24 tunnin kuluttua siemennyksestä sytokiinituotanto oli jo palautunut lähelle siemennystä edeltävää tasoa.

Fumuson ym. (2003) tekemässä tutkimuksessa havaittiin siemennyksenjälkeiselle pitkittyneelle kohtutulehdukselle herkkien tammojen IL-8 tuotannon olevan huomattavasti suurempaa estruksen aikana kuin normaaleilla tammoilla kun taas Woodward ym. tekemässä tutkimuksessa herkillä tammoilla IL-8 tuotanto oli normaaleja vähäisempää. Myös IL-10 kohdalla tutkimusten tulokset poikkesivat toisistaan. Fumuson ym. tutkimuksessa normaaleilla tammoilla IL-10 tuotanto oli runsasta estruksen aikana ja siemennys vähensi tuotantoa. Woodward ym. tekemässä tutkimuksessa normaalien tammojen IL-10 tuotanto oli vähäistä sekä ennen siemennystä että 24 tuntia siemennyksen jälkeen. Muiden sytokiinien osalta tutkimusten tulokset eivät suuresti eroa toisistaan. Pienet erot voivat selittyä suhteellisen pienellä otoskoolla ja tammojen yksilöllisellä vaihtelulla. Myös erot tutkimusmenetelmissä saattavat vaikuttaa tuloksiin.

#### 5.2.3 Sperman laimennusnesteiden vaikutus sytokiinituotantoon

Siittiöiden ja seminaaliplasman lisäksi myös spermanlaimentimet aiheuttavat paikallista tulehdusreaktiota kohdussa. Palm ym. (2008) tekemässä tutkimuksessa kiimassa olevien tammojen kohtuun ruiskutettiin joko maitojauhe- tai munankeltuaispohjaista sperman laimennusnestettä, fosfaattipuskuroitua suolaliuosta tai seminaaliplasmaa, joka ei sisältänyt siittiöitä. Kohtueritteestä otettiin näyte ja kohdun seinämästä biopsia tutkittavaksi 12 tuntia laimennusnesteiden, suolaliuoksen tai seminaaliplasman annostelun jälkeen. Vertailua varten tutkimukseen osallistuvilta hevosilta oli otettu kontrollinäyte edellisen kiiman yhteydessä. Näytteistä selvitettiin IL-1 $\beta$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$  ekspressiota endometriumissa ja polymorfinukleaaristen neutrofiilien määrää kohdun eritteessä. Koska kontrolliksi tarkoitettu suolaliuos aiheutti merkittäviä muutoksia endometriuminnassa, vertailukohtana käytettiin suolaliuoksen sijaan ennen laimennusnesteiden annostelua otettuja näytteitä.

Kaikki tutkimuksessa kohtuun ruiskutetut aineet, myös kontrolliksi tarkoitettu suolaliuos, aiheuttivat tutkittujen sytokiinien tuotannon lisääntymistä tammojen



endometriumissa. Voimakkaimmin lisääntyi IL-6 tuotanto käytettäessä maitojauhepohjaista laimennusnestettä tai seminaaliplasmaa. Munankeltuaispohjainen laimennusneste aiheutti lievimmän tulehdusreaktion vertailtaessa neutrofiilien pitoisuutta kohtueritenäytteessä. Maitojauhepohjainen laimennusneste, suolaliuos ja seminaaliplasma aiheuttivat kaikki selvästi munankeltuaista suuremman neutrofiili-infiltraation (Palm ym. 2008) .

Tämän tutkimuksen perusteella sperman laimennusnesteet eivät ole merkittäviä tulehdusvastetta lisääviä tekijöitä. Sen sijaan joillakin sperman laimennusnesteisiin käytetyillä aineilla saattaa olla tulehdusta hillitseviä vaikutuksia. Tulehdusta hillitseviä laimennusnesteitä voidaan hyödyntää tammoilla, joilla on ylimitoitettu tulehdusvaste siemennykseen.

### 5.3 Sytokiineihin perustuvat endometriitin hoidomuodot

Tutkimuksissa on pyritty selvittämään tehokasta hoitoa pitkittyneen siemennyksen jälkeisen kohtutulehduksen ehkäisyyn. Perinteisesti kohtutulehdusta on hoidettu kohtuhuuhteluiden, kohdun supistuksia lisäävän oksitosiinin ja antibioottien avulla (Woodward & Troedsson 2013). Sytokiinituotantoon vaikuttavilla aineilla olisi mahdollista hillitä tulehdusvastetta. Tutkimuksia on tehty glukokortikoidien ja *Mycobacterium phlei*-bakteerin soluseinästä valmistetun makrofageihin vaikuttavan immunomodulaattorin vaikutuksesta endometriumien sytokiinituotantoon ja tulehdusvasteeseen.

#### 5.3.1 Immunomodulaattorit

Fumuso ym. (2003) selvittivät *Mycobacterium phlei*-bakteerin soluseinästä valmistetun immunomodulaattorin (MPI) vaikutusta IL-1 $\beta$ -, IL-6- ja TNF- $\alpha$ -sytokiinin tuotantoon normaaleilla ja persistoivalle endometriitille herkillä tammoilla. Yllä mainittujen sytokiinin tuotanto määritettiin kiimassa, johon tammoja ei siemennetty sekä kiimassa, johon tammat siemennettiin tapetuilla siittiöillä. Tästä saatiin vertailuarvot MPI-tutkimuksen tulosten tulkintaan.

MPI-valmistetta annosteltiin 1,5 mg kerta-annoksena laskimon sisäisesti 16 tammalle tapetuilla siittiöillä tehdyn siemennyksen yhteydessä. Tammoilta otettiin koepalat kohdusta 24 tuntia siemennyksen jälkeen ja siemennystä seuraavan diestruksen aikana. MPI-valmisteen avulla saatiin herkillä tammoilla pro-inflammatoristen sytokiinien mRNA pitoisuudet samalle tasolle normaalien tammojen kanssa (Fumuso ym. 2003).

Rogan ym. (2007) tutkivat MPI:n vaikutusta kohtutulehduksen paranemiseen *Streptococcus zooepidemicus*-bakteerilla infektoiduilla tammoilla. Tutkimukseen valittiin 30 persistoivalle siemennyksenjälkeiselle kohtutulehdukselle herkkää tammaa. Tammat infektoidiin annostelemalla *S. zooepidemicus*-bakteeria kohtuun kiiman ensimmäisenä päivänä. 24 tunnin kuluttua infektio todennettiin tutkimalla kohtu ultraäänellä ja ottamalla kohdusta bakteriologinen ja sytologinen näyte sekä koepala. 48 tuntia infektoinnin jälkeen tammat jaettiin satunnaisesti neljään ryhmään. Kaksi ensimmäistä tammaryhmää hoidettiin annostelemalla 1,5 mg MPI-valmistetta joko kohtuun tai suonensisäisesti ja jälkimmäiset ryhmät saivat lumelääkettä niin ikään kohtuun tai suonensisäisesti. Tammat tutkittiin ovulaation jälkeisenä päivänä ja 7 vuorokauden kuluttua ovulaatiosta käyttäen samoja menetelmiä kuin infektoinnin jälkeen. Valmisteen tehokkuutta arvioitiin sen perusteella, kuinka hyvin kohtu oli puhdistautunut polymorfonukleaarista soluista ja bakteereista.

Kaikilla lumelääkkeillä hoidetuilla tammoilla kohtutulehdus jatkui edelleen 7 vuorokautta infektoinnin jälkeen kun taas MPI-valmisteella hoidetuista tammoista 35%:lla kohtutulehdus oli ohi ovulaatiota seuraavana päivänä ja 70%:lla 7 vuorokautta ovulaation jälkeen. MPI-valmisteen annostelureitillä ei ollut merkitystä. Tutkimus viittaa siihen, että MPI-valmisteella on positiivinen vaikutus bakteriellista kohtutulehduksesta paranemisessa (Rogan ym. 2007).

MPI-valmisteen vaikutusta sytokiinien IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  ja IL-1-RA tuotantoon ja kohdun puhdistautumiseen patogeeneistä sekä tulehduseritteestä on tutkittu *Escherichia coli*:lla infektoiduilla persistoivalle kohtutulehdukselle herkillä tammoilla. Saman tutkimuksen yhteydessä selvitettiin sytokiinien tuotanto tutkittavilla tammoilla ilman MPI-valmisteen käyttöä. Tutkimukseen osallistui viisi tammaa, jotka infektoidiin kohdunsisäisesti *E.coli*:lla kiiman aikana. Tammoilta otettiin sytokiinituotannon määrittystä varten koepalat kohdusta 3, 24 ja 72 tuntia infektoinnin jälkeen.

Tutkimuksessa ei havaittu MPI-valmisteella olevan vaikutusta sytokiinituotantoon endometriumiin, mutta sen huomattiin silti edistävän kohdun puhdistautumista patogeeneistä ja tulehduseritteestä (Christoffersen ym. 2012b). Tämä viittaa siihen, että MPI-valmiste ei toimi sytokiinivälitteisesti tai että välittäjäaineena toimii jokin muu kuin tutkimuksessa käsitelty sytokiini.

### 5.3.2 Glukokortikoidit

Siemennysketkellä laskimonsisäisesti annetun deksametasonin on todettu vähentävän kohdun tulehdusreaktiota persistoivalle siemennyksenjälkeiselle kohtutulehdukselle herkillä tammoilla. Deksametasonilla on myös todettu olevan positiivinen vaikutus endometriitille herkkien tammojen tiinehtyvyyteen (Bucca ym. 2008).

Glukokortikoidien vaikutusta sytokiinien IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  ja IL-1-RA tuotantoon ja kohdun puhdistautumiseen patogeeneistä sekä tulehduseritteestä selvitettiin *Escherichia coli*-bakteerilla infektoiduilla persistoivalle kohtutulehdukselle herkillä tammoilla. Tutkimukseen käytettiin samaa tammaryhmää sekä toteutettiin samalla kaavalla kuin MPI-tutkimus. Tammoille annettiin 0,1 mg/kg deksametasonia laskimonsisäisesti samanaikaisesti bakteeri-infektioon kanssa. Tutkimuksessa havaittiin glukokortikoidien vähentävän proinflammatoristen sytokiinien IL-1 $\beta$ , IL-6 ja IL-8 ja lisäävän anti-inflammatorisen sytokiinin IL-10 tuotantoa. Myös tässä tutkimuksessa glukokortikoidin havaittiin edistävän huomattavasti kohdun puhdistautumista patogeeneistä ja tulehduseritteestä (Christoffersen ym. 2012a). Tutkimuksen perusteella glukokortikoidien voidaan olettaa vaikuttavan sytokiinivälitteisesti.

## 6 ALKION TUOTTAMAT SYTOKIINIT

Implantaatiota edeltävänä aikana alkion ja emän välinen vuorovaikutus tähtää tiineyden tunnistamiseen ja säilymiseen. Spontaanisti ovuloivilla polysyklisillä eläimillä luteolyyisin estäminen on välttämätöntä tiineyden säilymiseksi. Nisäkkäiden alkioden on todettu erittävän useita eri sytokiineja, entsyymejä, prostaglandiineja ja hormoneita.

Useimmilla kotieläinlajeilla alkioden erittämällä interferoneilla (IFN) on keskeinen merkitys tiineyden tunnistamisessa. Esimerkiksi märehitijöillä alkion erittämä IFN- $\tau$  yhdessä muiden endokriinisten ja parakriinisten mekanismien kanssa pyrkii estämään luteolyysin (katsauksessa Schäfer-Somi 2003).

Hevosella ei kuitenkaan ole havaittu alkion erittävän interferoneita (Sharp ym. 1989). Tiineyden tunnistamisen oletetaan perustuvan alkion liikkeisiin kohdun lumenissa (McDowell ym. 1988). Alkion ja erityisesti sitä ympäröivien kalvojen läsnäolo kohdussa on erityisen tärkeää niinä päivinä, joille tamman seuraavan kiiman tulisi ajoittua. Tänä ajankohtana alkion läsnäolo selvästi inhiboi tamman endometriumien PGF2 $\alpha$  eritystä ja sitä kautta estää luteolyysiä (Sharp & McDowell 1985).

Hevosella alkio siirtyy munanjohtimesta kohtuun 6.0 - 6.5 päivän kuluttua ovulaatiosta. Seuraavan kymmenen päivän ajan alkio vaeltaa kohdun lumenissa molempien sarvien ja runko-osan alueella. Alkion liikkumisen saa aikaan kohdun lihaskerroksen rytmiset supistukset, joita puolestaan stimuloivat alkioden vapautuvat välittäjäaineet. Alkiorakkulan saavuttua kohdun puolelle sen ympärille kehittyy munasolun kettoon (zona pellucida) kiinnittyvistä alkiorakkulan erittämistä glykoproteiineista kapseli, joka ympäröi alkioden seuraavien 20 - 25 päivän ajan. Alkion liikkuminen kohdussa vähenee huomattavasti, kun ovulaatiosta on kulunut 15 - 17 päivää, sillä alkiorakkulan koon kasvu estää liikkumisen kapeammassa runko-osassa. Alkio jää jompaankumpaan kohdun sarveen. Myometriumien tonus lisääntyy ja pitää alkiorakkulaa paikoillaan. Alkio kääntyy rakkulan sisällä siten, että alkion selkäpuoli on vasten kohdun ventraalista seinämää. Napanuora ja allantois kehittyvät kohdun dorsaaliseinämän puolelle (katsauksessa Allen & Wilsher 2009).

Alkion lakattua liikkumasta alkaa organogeneesi, sikiökalvojen kasvu ja kehittyminen sekä kohtukuppien muodostuminen. Alkiorakkulan uloin kerros, trofoblasti alkaa muodostaa mikrovilluksia. Implantaatio tapahtuu villusten tarttuessa endometriumiin. Emän ja sikiön välille muodostuu diffuusi, mikrokotyledonaarinen, epiteliochoriaalinen istukka, joka vastaa sikiön ravitsemuksesta lopputiineyden ajan (katsauksessa Allen & Wilsher 2009).

## 6.1 Invasiivisten trofoblastisolujen sytokiinituotanto

Implantaatiossa trofoblastin invasiiviset solut vaeltavat endometriummin sisään. Tämä aiheuttaa tamman endometriumiin puolustusvasteen. Flaminio ym. (2004) tutkivat invasiivisten trofoblastisolujen vaikutusta tamman endometriummin lymfosyyttien sytokiinituotantoon sekä trofoblastisolujen omaa sytokiinituotantoa.

Trofoblastien sytokiinituotantoa on tutkittu myös muilla lajeilla. Ihmisen ja hiiren trofoblastien on todettu tuottavat proinflammatorisia sytokiineja IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ja TNF $\alpha$  ja anti-inflammatorisia sytokiineja IL-4, IL-10 ja TGF $\beta$  (Mitchell ym. 1993, Kauma 2000, Loke & King 2000). Proinflammatoriset sytokiinit vaikuttavat istukan kehittymiseen. Ne säätelevät trofoblastin proteaasien tuotantoa, apoptoosia sekä sytokiinien ja hormonien tuotantoa. Anti-inflammatoriset sytokiinit inhiboivat prostaglandiinin tuotantoa ja makrofagien sytokiinituotantoa ja helpottavat maternaalisen immunitetin sopeutumista tiineyteen (Shimoya ym. 1992, Shimonovitz ym. 1996).

Hevosen trofoblastien sytokiinituotantoa on tutkittu teurashevosilta otettujen elinnäytteiden avulla. Tutkimuksessa selvisi, että hevosen trofoblastien sytokiinituotanto poikkeaa ihmisen ja hiiren vastaavasta. Hevosen trofoblasti tuottaa pieniä määriä sytokiineja TNF $\alpha$  ja TGF $\beta$ , mutta sen ei havaittu tuottavan sytokiineja IL-2, IL-4, IL-10 tai IFN- $\gamma$  (Flaminio & Antczak 2005).

Samassa tutkimuksessa selvitettiin invasiivisten trofoblastisolujen vaikutusta lymfosyytteihin. Tutkimuksessa verrattiin kasvualustalla trofoblastisolujen kanssa kontaktissa olleiden lymfosyyttien ja kontrollialustalla olleiden lymfosyyttien IL-2, IL-4, IL-10, IFNG, TGF- $\beta$  ja TNF- $\alpha$ -tuotantoa. Invasiiviset trofoblastisolut heikentävät lymfosyyttien proliferaatiota ja aktivaatiota. Trofoblastien vaikutuksesta lymfosyyttien IL-4, IL-10 ja IFNG- sytokiinien tuotanto vähenee. Sen sijaan IL-2 tuotantoon trofoblastisoluilla ei ollut vaikutusta. Trofoblastisoluilla oli tutkimuksessa vaikutusta myös TGF- $\beta$  ja TNF- $\alpha$ -tuotantoon, mutta tulokset olivat näiden sytokiinien osalta riittämättömiä tarkempien johtopäätösten tekemiseen (Flaminio & Antczak 2005).

*Taulukko 6. Trofoblastien sytokiinituotanto hevosella, ihmisellä ja hiirellä (Shimoya ym. 1992, Shimonovitz ym. 1996, Flaminio & Antczak 2005).*

	hevonen	ihminen ja hiiri
IL-1 $\beta$		kyllä
IL-2	ei	kyllä
IL-4	ei	kyllä
IL-6		kyllä
IL-8		kyllä
IL-10	ei	kyllä
TNF $\alpha$	kyllä	kyllä
TGF $\beta$	kyllä	kyllä
INF- $\gamma$	ei	kyllä

Tutkimustulosten perusteella alkion ja valkosolujen välillä tapahtuu sytokiinivälitteistä viestintää. Alkoin erittämät sytokiinit pyrkivät heikentämään valkosolujen toimintaa ja siten suojaamaan alkioa emän immunitetilta.

## 6.2 Implantaation säätely

Tammalla on tutkittu IL-1RA ekspressiota kohdun limakalvolla implantaatiota ympäröivänä aikana. Tutkimuksen taustalla oli oletus, että tiineysvuorokausien 13 ja 25 välillä tapahtuvalla IL-1RA pitoisuuden nousulla olisi merkitystä tiineyden ylläpitoon. Tiineen kohdun limakalvon rauhasepiteelillä ja kohdun lumenissa IL-1RA pitoisuus kohosi huomattavasti tiineysvuorokausien 19 ja 25 aikana. Pitoisuus kohosi erityisesti alueella, jolla implantaatio tapahtui. Näin ollen voidaan olettaa, että IL-1RA pitoisuutta nostaa alkio tai sen erittämät aineet. In vitro-tutkimuksessa IL-1RA pitoisuuden nousun havaitaan olevan paikallisesti säädeltävissä estradioli-17 $\beta$ :n (E<sub>2</sub>) avulla. E<sub>2</sub>-pitoisuus on implantaation aikaan korkea alkion välittömässä läheisyydessä, vaikka samanaikaisesti veren E<sub>2</sub>-pitoisuus on matala (Haneda ym. 2009). IL-1RA:n lisääntyminen estää paikallisesti IL-1 välitteistä viestintää. Tällä saattaa olla merkitystä implantaation onnistumisessa tai tiineyden tunnistamisessa.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Sytokiinien merkitystä naaraan lisääntymiselimistön säätelyssä on tutkittu useilla lajeilla, mutta enemmistö tutkimuksista on tehty ihmisillä sekä laboratorioeläimillä. Sovellettaessa tai verrattaessa näiden tuloksia tammalla tehtyihin tutkimuksiin on muistettava erot eri lajien lisääntymisfysiologiassa. Sytokiinitutkimukset saattavat myös eri lajeilla painottua eri kohteisiin riippuen tutkittavalle lajille tyypillisistä ongelmista. Tammalla lisääntymiselimistön sytokiinitutkimukset painottuvat selvittämään pitkittyneeseen siemennyksenjälkeiseen kohtutulehdukseen vaikuttavia tekijöitä sekä oosyyttien kypsymisen ja ovulaation säätelyä. Muilta osin sytokiinien toimintaa yleisen lisääntymisfysiologian säätelyssä ei ole selvitetty yhtä laajasti kuin ihmisellä.

Lääkekehittelyn kannalta sytokiinit ovat kasvava mielenkiinnon kohde. Tutkittaessa ovulaatiota sääteleviä sytokiineja todettiin IL-1 $\beta$ :n olevan tamman ovulaatiota säätelevä parakriininen tekijä. Tätä tietoa voitaisiin soveltaa kehitettäessä ovulaation induktioon tarkoitettua lääkeainetta. Lääkeaine voisi toimia sytokiininvälitteisesti joko vaikuttamalla suotaan IL-1 $\beta$ -tuotantoon tai muuttamalla kohdekudoksessa IL-1-reseptorien määrää. Teoriassa tietoa sytokiinien osuudesta oosyytin maturaation ja ovulaation säätelyssä voitaisiin hyödyntää patologisten tilojen selvittämisessä sekä tarkan ovulaatioajankohdan arvioinnissa. Käytännössä tämä kuitenkin on vaikeaa, sillä näytteen ottaminen elävän tamman munasarjasta on turhan haastavaa ja traumaattista.

Keltarauhaseen kohdistuvien sytokiinitutkimusten toinen mielenkiinnon kohde on ollut keltarauhasen kehityksen ja surkastumisen säätely. Nämä tutkimukset auttavat ymmärretään mitkä tekijät voivat aiheuttaa tiineyden menetyksen keltarauhasen surkastumisen kautta.

Pitkittyneellä siemennyksenjälkeisellä kohtutulehduksella on suuri merkitys tamman tiinehtyvyyteen. Siksi tätä aihetta on tutkittu paljon. Tutkimusten avulla voidaan ymmärtää ongelman patogeneesi ja kehitellä siihen liittyviä hoitoja. Tammalla tehdyissä tutkimuksissa *Mycobacterium Phlei*-bakteerin soluseinästä valmistetun immunomodulaattorin ja glukokortikoidin havaittiin edistävän tamman kliinistä

parantumista infektiivisestä endometriitistä. Glukokortikoidien todettiin vaikuttavan sytokiinivälitteisesti, kun taas immunomodulaattorilla ei todettu vaikutusta tutkittujen sytokiinien tuotantoon, vaikka myös immunomodulaattori edisti kliinistä paranemista. Tämä saattaa johtua siitä, että immunomodulaattori toimii jonkun sellaisen sytokiinin tai välittäjäaineen kautta, jota ei näissä tutkimuksissa käsitelty.

Myöskään spermalaimentimien aiheuttamien tulehdusreaktioiden eroja ei pystytty selittämään sytokiinien avulla. Tutkimuksissa havaittiin, että spermanlaimentimilla on merkitystä tulehdusvasteeseen. Kuten immunomodulaattoritutkimuksessa, tässäkin syynä siihen että endometriumien sytokiinituotannossa eri spermanlaimentimia käytettäessä ei havaittu eroja saattaa selittyä tutkimukseen valituilla sytokiineilla. Toinen selittävä tekijä sytokiinitutkimuksissa havaittujen sytokiinien tuotannon huonon korrelaation kliinisten muutosten kanssa saattaa olla se, että tutkimuksissa määritellään vain sytokiinien geeniekspressiota, mutta ei sytokiinireseptoreiden geeniekspressiota kohdekudoksessa. On mahdollista, että sytokiinien tuotanto ei muutu, mutta sytokiinireseptoreiden määrä sen sijaan muuttuu, jolloin saadaan aikaan sytokiinivälitteinen vaikutus.

Kenties suurin jatkotutkimusten tarve saattaa olla alkion ja emän välisen viestinnän osalta, sillä tältä aihealueelta tutkimuksia on tehty suhteellisen vähän. Tiineyden tunnistaminen ja alkion suojautuminen emän immunitetilta ovat keskeisiä tekijöitä tiineyden jatkumisen kannalta. Muilla lajeilla tehtyjä tutkimuksia voidaan huonosti soveltaa hevoselle sen alkutiineyden erityispiirteiden vuoksi.

## KIRJALLISUUSLUETTELO

Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonat M* 2006, 11: 279-295.

Alghamdi A, Troedsson MHT, Laschkewitsch T, Xue JL. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology* 2001, 55: 1019-1028.



Allen WR, Wilsher S. A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare. *Placenta* 2009, 30: 1005-1015.

Brännström M. Chapter 15 - Potential Role of Cytokines in Ovarian Physiology: The Case for Interleukin-1. *Teoksessa: The Ovary (Second Edition)*. Academic Press, San Diego 2003: 261-271.

Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology* 2008, 70: 1093-1100.

Christoffersen M, Woodward EM, Bojesen AM, Petersen MR, Squires EL, Lehn-Jensen H, Troedsson MHT. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology* 2012a, 78: 991-1004.

Christoffersen M, Woodward EM, Bojesen AM, Petersen MR, Squires EL, Lehn-Jensen H, Troedsson MHT. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology* 2012b, 78: 991-1004.

De Los Santos MJ, Anderson DJ, Racowsky C, Simón C, Hill JA. Expression of interleukin-1 system genes in human gametes. *Biol Reprod* 1998, 59: 1419-1424.

Field SL, Dasgupta T, Cummings M, Orsi NM. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Mol Reprod Dev* 2013, 81: 284-314.

Flaminio MJBF, Antczak DF. Inhibition of lymphocyte proliferation and activation: a mechanism used by equine invasive trophoblast to escape the maternal immune response. *Placenta* 2005, 26: 148-159.

Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol* 2007, 118: 30-39.

Fumuso E, Giguère S, Wade J, Rogan D, Videla-Dorna I, Bowden RA. Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-

breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol* 2003, 96: 31-41.

Galvão A, Skarzynski DJ, Szóstek A, Silva E, Tramontano A, Mollo A, Mateus L, Ferreira-Dias G. Cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  participate in modulation of the equine corpus luteum as autocrine and paracrine factors. *J Reprod Immunol* 2012, 93: 28-37

Gerard N, Caillaud M, Martoriati A, Goudet G, Lalmanach A. The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol* 2004, 180: 203-212.

Grell M, Scheurich P. Tumor necrosis factor. Teoksessa: Growth Factors and Cytokines in Health and Disease. 3.p. Leroith & Bondy, Maryland 1997: 669-726.

Haneda S, Nagaoka K, Nambo Y, Kikuchi M, Nakano Y, Matsui M, Miyake Y, Macleod JN, Imakawa K. Interleukin-1 receptor antagonist expression in the equine endometrium during the peri-implantation period. *Domest Anim Endocrinol* 2009, 36: 209-218.

Harada A, Sekidi N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J leukocyte biol* 1994, 56: 559.

Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M. Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1 p. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki 2011.

Jensen LE, Whitehead AS. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J* 1998, 334: 489-503.

Katila T. Uterine defence mechanisms in the mare. *Anim Reprod Sci* 1996, 42: 197-204.

Kauma SW. Cytokines in implantation. *J rep fer S* 2000, 55: 31-42.

Kelly R, King A, Critchley H. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 2001, 121: 3-19.

Kol S, Donesky BW, Ruutiainen-Altman K, Ben-Shlomo I, Lrahara M, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. Ovarian interleukin-1 receptor antagonist in rats: Gene expression, cellular localization, cyclic variation, and hormonal regulation of a potential determinant of interleukin-1 action. *Biol Reprod* 1999a, 61: 274-282.

Kol S, Ruutiainen-Altman K, Scherzer WJ, Ben-Shlomo I, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. The rat intraovarian interleukin (IL)-1 system: cellular localization, cyclic variation and hormonal regulation of IL-1 $\beta$  and of the type I and type II IL-1 receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1999b, 149: 115-128.

Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 1994, 41: 629-636.

Krakauer T, Oppenheim JJ. Interleukin 1 and its Receptors. Teoksessa: Editor-in-Chief: Peter J. Delves (toim.) *Encyclopedia of Immunology* 2.p. Elsevier, Oxford 1998: 1429-1435.

Loke YW, King A. Immunological aspects of human implantation. *J rep fer S* 2000, 55: 83-90.

Maischberger E, Irwin JA, Carrington SD, Duggan VE. Equine post-breeding endometritis: A review. *Ir Vet J* 2008, 61: 163-168.

Martoriati A, Caillaud M, Goudet G, Gérard N. Inhibition of in vitro maturation of equine oocytes by interleukin 1 $\beta$  via specific IL-1 receptors. *Reproduction* 2003a, 126: 509-515.

Martoriati A, Duchamp G, Gérard N. In vivo effect of epidermal growth factor, interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-1RA on equine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 2003b, 68: 1748-1754.

Martoriati A, Gérard N. Interleukin-1 (IL-1) system gene expression in granulosa cells: Kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. *Reprod Biol Endocrin* 2003, 1: 42.

Martoriati A, Lalmanach A, Goudet G, Gérard N. Expression of Interleukin-1 (IL-1) System Genes in Equine Cumulus-Oocyte Complexes and Influence of IL-1 $\beta$  During In Vitro Maturation. *Biol Reprod* 2002, 67: 630-636.

Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph D.A, Weis F.M.B, Zentella A. Transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer surv* 1992, 12:81-103.

McDowell KJ, Sharp DC, Grubbaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol Reprod* 1988, 39: 340-348.

Mette C, Camilla Dooleweerd B, Stine J, Anders Miki B, Morten Roenn P, Henrik L. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol* 2010a, 138: 95-105.

Mette C, Camilla Dooleweerd B, Stine J, Anders Miki B, Morten Roenn P, Henrik L. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol* 2010b, 138: 95-105.

Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. *Placenta* 1993, 14: 249-275.

Moore K, de Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, 19: 683-765.

Mühl H, Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol* 2003, 3: 1247-1255.

Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA. Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Anim Reprod Sci* 2010, 119: 31-39.

Palm F, Walter I, Budik S, Kolodziejek J, Nowotny N, Aurich C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology* 2008, 70: 843-851.

Prins JR, Gomez-Lopez N, Robertson SA. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *J Reprod Immunol* 2012, 95: 1-14.

Rogan D, Fumuso E, Rodríguez E, Wade J, Sánchez Bruni SF. Use of a Mycobacterial Cell Wall Extract (MCWE) in Susceptible Mares to Clear Experimentally Induced Endometritis With *Streptococcus zooepidemicus*. *J Equine Vet Sci* 2007, 27: 112-117.

Schäfer-Somi S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Anim Reprod Sci* 2003, 75: 73-94.

Sharp DC, McDowell KJ, Weithenauer J, Franklin K, Mirando M, Bazer FW. Is an interferon-like protein involved in the maternal recognition of pregnancy in mares? *Equine Vet J* 1989, 21: 7-9.

Sharp DC, McDowell KJ. Critical events surrounding the maternal recognition of pregnancy in mares. *Equine Vet J* 1985, 17: 19-22.

Shimonovitz S, Hurwitz A, Barak V, Dushnik M, Adashi EY, Anteby E, Yagel S. Cytokine-mediated regulation of type IV collagenase expression and production in human trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 3091-3096.

Shimoya K, Matsuzaki N, Taniguchi T, Kameda T, Koyama M, Neki R, Saji F, Tanizawa O. Human placenta constitutively produces interleukin-8 during pregnancy and enhances its production in intrauterine infection. *Biol Reprod* 1992, 47: 220-226.

Silvennoinen O, Hurme M. Uutta sytokiineista. *Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim* 2003, 2003;119(8): 773-779.

Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 1999, 52: 461-471.

Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci* 2001, 68: 273-278.

Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, Squires EL, Troedsson MHT. Endometrial inflammatory markers of the early immune

response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction* 2013, 145: 289-296.

Woodward EM, Troedsson MH. Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. *J Equine Vet Sci* 2013, 33: 673-682.